



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑲ Aktenzeichen: 195 16 673.6  
⑳ Anmeldetag: 28. 4. 95  
㉔ Offenlegungstag: 31. 10. 96

DE 195 16 673 A 1

⑦① Anmelder:

Pecher, Gabriele, Dr., 13125 Berlin, DE

⑦② Erfinder:

gleich Anmelder

⑤④ Vakzine gegen Tumorerkrankungen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Vakzine gegen humane Tumorerkrankungen, bestehend aus bestrahlten humanen autologen EBV-immortalisierten B-Zellen, die mit Abschnitten des humanen Muzin-Gens MUC1 mittels eines MUC1-Genabschnitte enthaltenden Vektors transfiziert sind und die durch Behandlung mit einem Glykosylierungsinhibitor tumor-assoziierte Epitope exprimieren.

AK

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 09. 96 602 044/452

2/26

Die Erfindung betrifft eine zelluläre Vakzine gegen Tumorerkrankungen und ihre Verwendung. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die Gentechnik.

Zelluläre Vakzinen gegen Tumorerkrankungen sind seit längerem bekannt. Die klassische und vielfach klinisch eingesetzte zelluläre Vakzine besteht aus einem Gemisch von bestrahlten Tumorzellen und Adjuvantien wie beispielsweise Lysate von *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) oder *Corynebacterium Parvum*. Nach zwei Jahrzehnten klinischer Erprobung läßt sich zusammenfassen, daß diese Vakzine keine ausreichende Wirkung zeigt (siehe Übersichtsartikel: Oettgen, H. und Old, L., *The History of Cancer Immunotherapy*, in: *Biological Therapy of Cancer*, Eds. V. deVita, S. Hellman and S. Rosenberg, J.B. Lippincott Company 1991, S. 87—119).

In jüngerer Zeit wurden Versuche unternommen, Tumorzellen genetisch zu modifizieren, mit dem Ziel, eine Immunantwort gegen den Tumor auszulösen. Verwendet werden dazu vor allem Gene für Zytokine oder kostimulierende Moleküle allein oder in Kombination. Der Nachteil dieser Vakzine besteht darin, daß zu ihrer Herstellung Tumorzellen verwendet werden müssen. Diese stellen ein Potential für eine mögliche Metastasenbildung dar, und somit stellt diese Vakzine bei ihrer Anwendung ein Risiko für den Patienten dar. Außerdem ist nicht klar definiert, gegen welche immunogenen Strukturen auf den Tumorzellen eine Immunantwort ausgelöst wird. Erfolgt z. B. eine Reaktion gegen Autoantigene (immunogene Strukturen, die nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf gesunden Zellen vorhanden sind), ist es möglich, daß Autoimmunreaktionen durch diese Art von Vakzine ausgelöst werden.

Deshalb wurde in letzter Zeit darauf fokussiert, tumorspezifische Antigene zu finden. Ein solches Antigen ist das Muzinmolekül.

Das Glykoprotein Muzin, kodiert durch das Gen MUC1, ist sowohl auf der Oberfläche von Pankreas-, Mamma-, Kolon-, Parotis- und Ovarialkarzinomen als auch auf den entsprechenden gesunden Zellen exprimiert. Die Besonderheit von MUC1 liegt darin, daß es 20 bis 100 "Tandem repeats" enthält. Ein "Tandem repeat" besteht aus 60 Nukleotiden, die ein Polypeptid von 20 Aminosäuren kodieren (s. Abb. 1).

Infolge einer unvollständigen Muzin-Glykosylierung im Fall der malignen Entartung liegen auf Tumorzellen jedoch Muzin-Peptid-Epitope frei, die vom Immunsystem, insbesondere von T-Zellen, als fremd erkannt werden können (diese Peptid-Epitope sind auf gesunden Zellen von Kohlenhydraten "verdeckt" und lösen deshalb bei normalen Zellen keine Immunreaktion aus). Diese Muzin-Epitope sind für eine Stimulierung des Immunsystems geeignet.

Es hat bereits Versuche gegeben, Muzin-Epitope mittels Gentransfer in humanen Zellen für in vitro Studien zur Expression zu bringen. Der Vektor pDKOF/MUC1, der dazu verwendet wurde (Jerome K.R., D. Bu, and O.J. Finn. 1992. Expression of tumor-associated epitopes on Epstein-Barr Virus-immortalized B-cells and Burkitts lymphomas transfected with epithelial mucin complementary DNA. *Canc. Res.* 52: 5985—5990) führt jedoch in humanen Zellen nicht zu einer effizienten und stabilen Muzin-Epitop-Expression und ist somit für die Verwendung in einer Vakzine nicht geeignet.

Die Erfindung hat das Ziel, die Nachteile der bekannten zellulären Vakzinen zu beseitigen. Es soll gentechnisch eine Vakzine entwickelt werden, die das Immunsys-

tem gegen bereits in Körper vorhandene Tumorzellen spezifisch stimuliert und zur Verkleinerung bzw. Beseitigung des Tumors führen soll.

Dieses Ziel wird durch eine Vakzine gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Die Vakzine besteht aus bestrahlten humanen autologen, EBV-immortalisierten B-Zellen, die mit Abschnitten des MUC1-Gens per Elektroporation (unter Verwendung des Plasmides pRep/MUC1) transfiziert werden und mit dem Glykosylierungsinhibitor Phenyl N-Acetyl- $\alpha$ -D-Galactosaminide (Phenyl-GalNac) behandelt werden.

EBV-immortalisierte B-Zellen stellen, anders als Tumorzellen, für den Patienten kein Risiko dar, weil ca. 90% aller Patienten eine starke Immunreaktion gegen EBV aufweisen und nur solche Patienten nach entsprechender Vorprüfung einer Therapie zugeführt werden.

Die Wirksamkeit der Vakzine beruht auf folgendem Prinzip: Infolge der unvollständigen Glykosylierung des Glykoproteins Muzin im Fall der malignen Entartung liegen auf Tumorzellen Peptid-Epitope frei, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden können. Die dadurch ausgelöste Aktivierung des Immunsystems reicht bei Tumorpatienten nicht aus, um den Tumor zu beseitigen, weil keine Costimulation erfolgt. Mit der hier beanspruchten Vakzine wird eine effiziente, tumorspezifische Immunantwort, die auf der Aktivierung Muzinepitop-spezifischer, zytotoxischer T-Zellen beruht und dadurch zur Verkleinerung bzw. zur Beseitigung des Tumors führt, in Tumorpatienten ausgelöst. EBV immortalisierte B-Zellen exprimieren, im Gegensatz zu Tumorzellen, die für eine optimale T-Zellaktivierung notwendigen kostimulierenden Moleküle, wie z. B. B7.1 und B7.2 sowie ICAM1 und LFA3. Darüber hinaus produzieren sie Interleukin-12 und haben einen Adjuvant-Effekt. Werden EBV immortalisierte B-Zellen mit MUC1 (22 Kopien der "Tandem repeat"-Sequenz von MUC1 kloniert in den Plasmidvektor pRep4) transfiziert und mit dem Glykosylierungsinhibitor Phenyl-GalNac behandelt, exprimieren diese die tumorassoziierten Epitope. Die auf diesem Wege erreichte Kombination von Bereitstellung von kostimulierenden Molekülen und einer genügenden Anzahl von tumorassoziierten Epitopen führt in vivo zu einem Anstieg der Muzinepitopspezifischen T-Zellen, die für eine Tumorabstoßung erforderlich sind. Die Vakzine ist für die Therapie bei Patienten mit Muzin (MUC1) exprimierenden Tumoren einsetzbar. Die Anwendung dieser Vakzine kann ebenfalls bei Gesunden zur Vorbeugung eines Muzin (MUC1) exprimierenden Tumors erfolgen. Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Vakzine gegenüber bisher verwendeten zellulären Vakzinen besteht darin, daß keine Tumorzellen eingesetzt werden, sondern nur ein klar definiertes Antigen.

Die Erkennung dieser Muzin-Peptid-Epitope durch zytotoxische T-Zellen folgt nicht der bekannten klassischen Weg der Erkennung von kurzen Peptid-Epitopen in Verbindung mit dem HLA-Komplex. Die Muzin-Peptid-Epitope werden ohne "Hilfe" des HLA-Komplexes von den T-Zellen erkannt. Diese Besonderheit bei der Erkennung der tumorassoziierten Muzin-Epitope erklärt sich aus der oben genannten besonderen "Tandem repeat"-Struktur des Moleküls sowie der hohen Dichte des Antigens auf der präsentierenden Zelle. Die mehrfache Wiederholung des immunogenen Peptid-Epitop-Motivs führt zu einer Aktivierung der T-Zellen durch ein "Crosslinking" der T-Zell-Rezeptoren, ohne daß der HLA-Komplex beteiligt sein muß. Das ermöglicht den

Einsatz der Vakzine, die die entsprechenden Muzin-Epitope enthält, bei jedem Patienten, unabhängig vom HLA-Typ. Das bedeutet einen Vorteil gegenüber Vakzinen, die nur bei Patienten mit dem jeweiligen für die Präsentation des Epitopes passenden HLA-Typ verabreicht werden können.

Die Verwendung des Gens für Muzin bzw. von 15–30 "Tandem repeats" in der Vakzine ermöglicht die Expression einer hohen Anzahl der Epitope und somit ihr Funktionieren auf dem Prinzip des "Crosslinkings" der T-Zell-Rezeptoren.

Die mit pRep4/MUC1 transfizierten Zellen werden mit dem Glykolyseinhibitor Phenyl-N-Acetyl- $\alpha$ -D-Galactosaminide für 24 bis 48 Stunden behandelt, damit die immunogenen, tumorassoziierten Muzin-Epitope exprimiert werden. Die Expression kann durch eine FACS-Analyse mittels Muzin-Epitopspezifischer Antikörper überprüft werden. Die so hergestellten Zellen werden bestrahlt (mindestens mit 10 000 rad). Auch nach Bestrahlung (bis zu 20 000 rad) exprimieren die Zellen die relevanten Epitope.

Bevorzugt ist die Behandlung von Mamma-, Pankreas-, Ovarial-, Colon-, Parotis- und Lungentumoren. Die Behandlung erfolgt gewöhnlich mittels subkutaner Applikation der Vakzine in einer Konzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen im Abstand von 3 Wochen bei einer Gesamtbehandlungszeit von 4 Monaten.

Gegenstand der Erfindung ist auch der Vektor zur Transfektion der EBV-immortalisierten B-Zellen, der aus folgenden wesentlichen Bestandteilen besteht:

- Promotor RSV-LTR für Muzin (MUC1)-Genabschnitte
- Hygromycin-Resistenzgen unter dem Promotor TK
- EBNA-1-Gen
- Abschnitte des MUC1-Gens

(vgl. Abb. 1).

Die Erfindung soll nachstehend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

#### Ausführungsbeispiel

##### Herstellung und Verwendung der Vakzine

Aus humanem peripherem Blut werden Lymphozyten per Ficoll-Gradienten-Zentrifugation gewonnen. Die B-Lymphozyten werden mittels EBV, produziert von einer Zelllinie (z. B. B-95 oder MCU-V5), immortalisiert. In die so entstandenen EBV immortalisierten B-Zellen wird das Plasmid pRep4/MUC1 (das 22 Kopien der "Tandem repeat"-Sequenz von MUC1 enthält, s. Abb. 1 und 2) per Elektroporation transfiziert. Das Plasmid besitzt das Hygromycin-Resistenzgen, so daß die transfizierten Zellen in Hygromycin-haltigem Medium selektiert werden. Die MUC1-Expression wird mittels Western-Blot-Verfahren sowie FACS-Analyse mittels monoklonaler Muzin-Antikörper überprüft. In das Kulturmedium der transfizierten Zellen wird Phenyl-N-Acetyl- $\alpha$ -D-Galactosaminide (Konzentration: 5 mM) für 36 Stunden gegeben. Die Zellen werden sofort nach Ablauf dieser Zeit bestrahlt (10 000 rad). Die Expression der durch den Glykosylierungsinhibitor erzeugten, tumorassoziierten immunogenen Muzin-Peptid-Epitope hält nun für 24 Stunden an (Überprüfung mittels monoklonaler Muzin-Peptid-Antikörper in FACS-Analyse). In dieser Zeit wird die Vakzine (= bestrahlte, humane

autologe EBV immortalisierte B-Zellen transfiziert mit MUC1 und mit Phenyl-N-Acetyl- $\alpha$ -D-Galactosaminide behandelt) appliziert (subkutane Injektion).

#### Patentansprüche

1. Vakzine gegen humane Tumorerkrankungen, bestehend aus bestrahlten humanen autologen EBV-immortalisierten B-Zellen, die mit Abschnitten des humanen Muzin-Gens MUC1 mittels eines MUC1-Genabschnitte enthaltenden Vektors transfiziert sind und die durch Behandlung mit einem Glykosylierungsinhibitor tumorassoziierte Epitope exprimieren.

2. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Abschnitte des humanen Muzin-Gens MUC1 mit dem Vektor pRep4 mit folgenden wesentlichen Bestandteilen

- Promotor RSV-LTR für Muzin (MUC1)-Genabschnitte
- Hygromycin-Resistenzgen unter dem Promotor TK
- EBNA-1-Gen
- Abschnitte des MUC1-Gens

gemäß Abb. 1 transfiziert worden sind.

3. Vakzine nach Anspruch 1–2, dadurch gekennzeichnet, daß die Abschnitte des MUC1-Gens im Vektor 15–30 "Tandem Nukleotidrepeats" enthalten, wobei ein repeat die Nukleotid-Sequenz gemäß Abb. 2 aufweist.

4. Vakzine nach Anspruch 1–3, dadurch gekennzeichnet, daß die Abschnitte des MUC1-Gens im Vektor 22 "Tandem Nukleotidrepeats" enthalten.

5. Vakzine nach Anspruch 1–4, dadurch gekennzeichnet, daß als Glykosylierungsinhibitor Phenyl-N-Acetyl- $\alpha$ -D-Galactosaminide eingesetzt wird.

6. Vakzine nach Anspruch 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch Elektroporation erfolgt.

7. Vakzine nach Anspruch 1–6, dadurch gekennzeichnet, daß eine letale Bestrahlung mit mindestens 10 000 rad erfolgt.

8. Verfahren zur Herstellung der Vakzine nach Anspruch 1–7, dadurch gekennzeichnet, daß aus humanem peripheren Blut B-Lymphozyten mittels EBV, produziert von einer Zelllinie, immortalisiert werden, diese autologen EBV-immortalisierten B-Lymphozyten bzw. spontan wachsende B-Zellen des peripheren Blutes des Probanden mit dem Vektor gemäß Abb. 1 per Elektroporation transfiziert werden, die erhaltenen transfizierten Zellen im Kulturmedium 24–48 Stunden mit 5 mM des Glykosylierungsinhibitors behandelt werden und anschließend mit mindestens 10 000 rad bestrahlt werden.

9. Verwendung der Vakzine nach Anspruch 1–7 zur Behandlung von Muzin exprimierenden Tumoren, wie z. B. Mamma-, Pankreas-, Ovarial-, Colon-, Parotis- und Lungentumoren.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

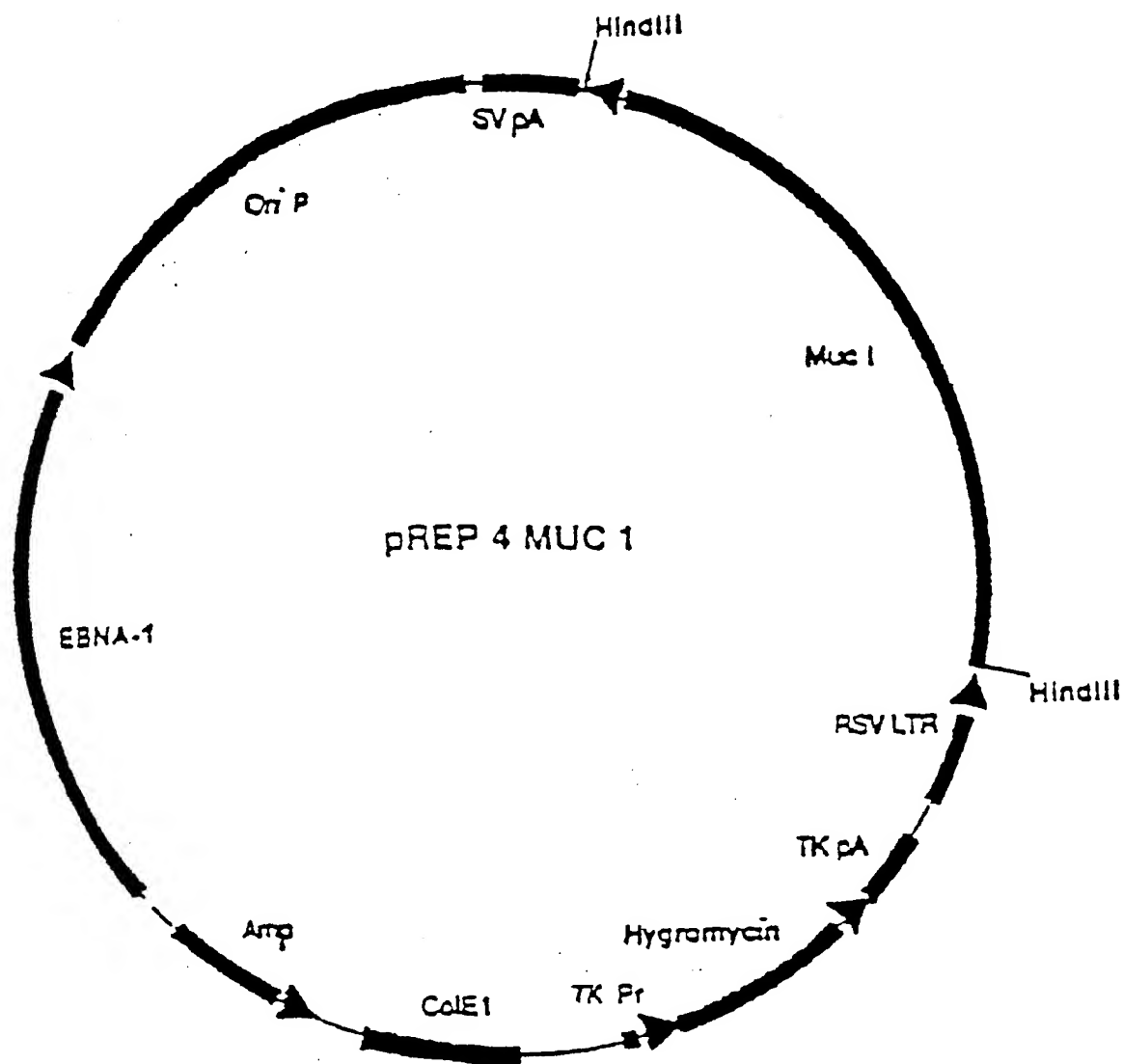


Abb. 1

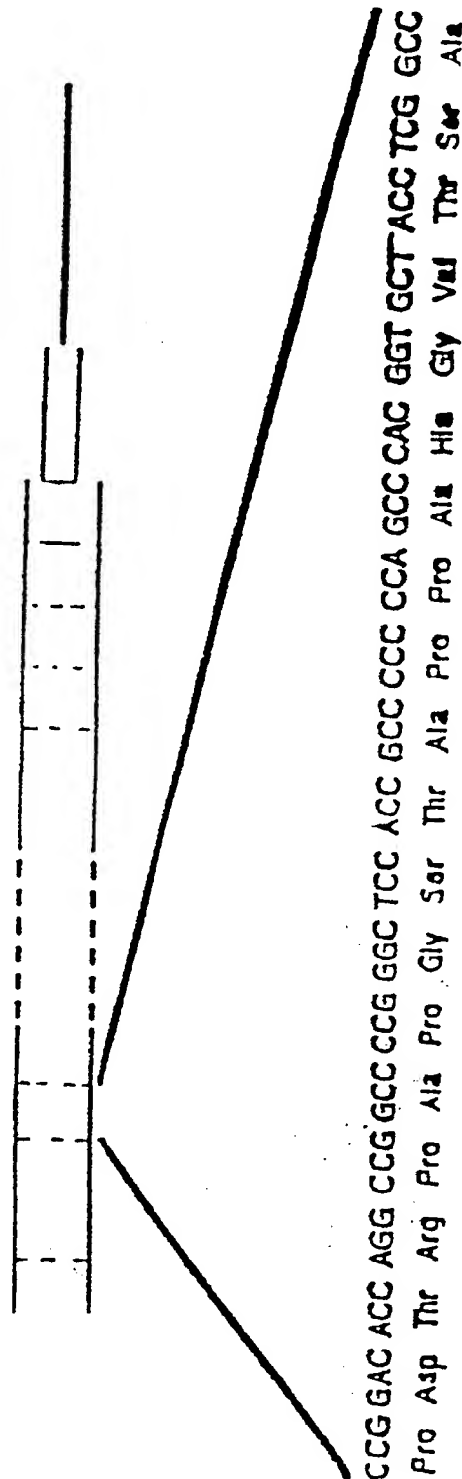
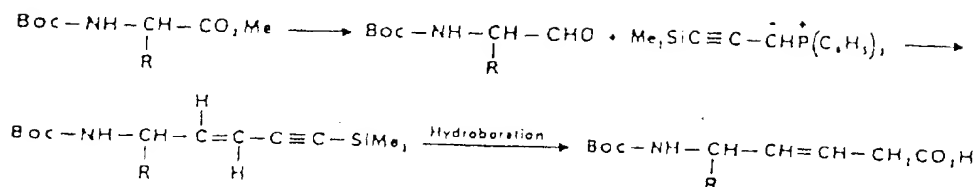
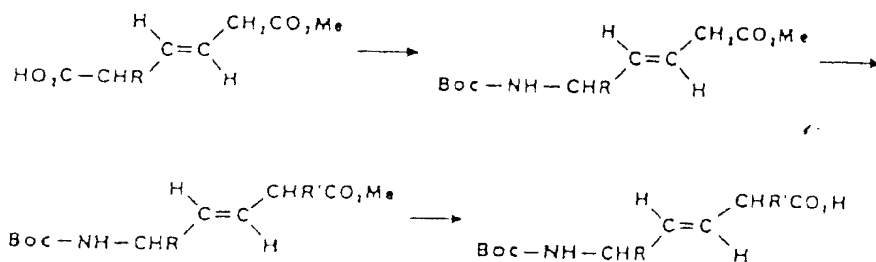


Abb. 2

METHOD A (Yields  $X = \psi[CH=CH]$  Gly [137])METHOD B (Yields racemic  $X = \psi[CH=CH]$  Yyy [138])Scheme 1. Synthesis of  $\psi[CH=CH]$  pseudodipeptides.

terminal amides. On the other hand, an "interior-modified" pGlu-Phe $\psi[CH=CH]$ Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> substance P hexapeptide analog was found to be equipotent to the parent structure [116]. An ACE inhibitor containing a  $\psi[CH=CH]$  linkage, Bz-Phe $\psi[trans-CH=CH]$ Gly-Pro, was moderately effective, although several orders of magnitude less so than the corresponding  $\psi[COCH_2]$  analog [46].

C.  $\psi[CH_2S]$ ,  $\psi[CH_2SO]$ ,  $\psi[CHCH_2S]$ 

The  $\psi[CH_2S]$  amide bond replacement is a versatile and resistant replacement that is accessible by several synthetic routes, due to the incorporation of a highly nucleophilic sulfur atom. While the increased flexibility of a single bond in place of the quasiplanar amide bond must be considered, the lipophilic character of this replacement could offer counteracting advantages, again contingent on requirements for the modified peptide.